

⊖ To be mailed ⊕

PTO 02-3910

Japanese Kokai Patent Application
No. Hei 1[1989]-172332

PREVENTION AND TREATMENT DRUGS FOR BOVINE MASTITIS

Kenji Shibata et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. AUGUST 2002
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

JAPANESE PATENT OFFICE
PATENT JOURNAL (A)
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 1[1989]-172332

Int. Cl. ⁴ :	A 61 K 35/78 A 23 K 1/16 1/18
Sequence Nos. for Office Use:	8413-4C C-6754-2B B-6754-2B
Filing No.:	Sho 62[1987]-328329
Filing Date:	December 26, 1987
Publication Date:	July 7, 1989
Number of Inventions:	2 (Total 6 pages)
Examination Request:	Not filed

PREVENTION AND TREATMENT DRUGS FOR BOVINE MASTITIS

[Ushi No Nyuboen No Yobo Oyobi Chiryozai]

Inventors:	Kenji Shibata, et al.
Applicant:	Nippon Seifun K.K.

Claims

1. Prevention and treatment drugs for staphylococcal bovine mastitis, containing 1 or 2 kinds or more of herbal medicines selected from a group comprising kanzo, huang-lian, ougon, kouboku, tianjin, zhi-mu, chouji, kujin, keihi, biwayou, hops, youbaihi, enmeiso, gobaishi, sanshuyu, shakuyaku, jin ying, chiyu and maou.
2. The prevention and treatment drugs according to the description of Claim 1, in that the herbal medicine is in crude powder form.
3. The prevention and treatment drugs according to the description of Claim 1, in that the herbal medicines are herbal medicine extracts extracted with a mixture of water and organic solvents or with water, and/or the active ingredients from herbal medicines obtained therefrom.

4. The prevention and treatment drugs according to the description of Claim 1, obtained by incorporating the herbal medicines into feed.

5. Prevention and treatment methods for staphylococcus due to bovine staphylococci by administering an effective quantity of herbal medicine comprising 1 or 2 kinds or more of herbal medicines selected from a group comprising kanzo, huang-lian, ougon, kouboku, tianjin, zhi-mu, chouji, kujin, keihi, biwayou, hops, youbaihi, enmeiso, gobaishi, sanshuyu, shakuyaku, jin ying, chiyu and maou.

6. The prevention and treatment methods according to the description of Claim 5, in that the herbal medicines are utilized in crude powder form.

7. The prevention and treatment methods according to the description of Claim 5, in that the herbal medicines are herbal medicine extracts extracted with a mixture of water and organic solvents or with water, and/or the active ingredients of herbal medicines obtained therefrom.

8. The prevention and treatment methods according to the description of Claim 5, in that the herbal medicine is administered by incorporating it into feed.

Detailed explanation of the invention

Industrial application field

This invention pertains to prevention and treatment drugs for bovine mastitis, as well as to the prevention and treatment methods.

More specifically, it pertains to prevention and treatment drugs containing herbal medicines for staphylococcal bovine mastitis, as well as to prevention and treatment methods comprising the administration of the herbal medicines.

Prior art

Staphylococcal bovine mastitis is a kind of mastitis of cow due to infection caused by staphylococcus, particularly *Staphylococcus aureus*.

The disease causes reduction of milk production, deterioration of milk quality and shortens the years of milk production service, and also becomes source of infection for other cows, bringing enormous damage to the operation of a dairy farmer. Furthermore, milk contaminated by bacteria pose a very undesirable public health problem.

Despite the fact that there is such a serious infectious disease, almost no sound countermeasure, such as enforcing appropriate breeding management, is available, and in reality prevention is often not possible.

Also, up to this point, methods such as administering antibiotics or other antibacterial together with feed has been carried out to prevent and treat this disease. However, in recent years particular problems have emerged including concerns with drug-resistance or the problem of

residual drugs including antibiotics, and there has been an increasing tendency to question the appropriateness of administering antibiotics to farm animals. Therefore, it is desirable that prevention and treatment methods and prevention and treatment drugs for this disease be developed without the administration of drugs such as antibiotics.

Means to solve the problems

The present inventors conducted investigations aimed at solving the aforementioned problems, and as a result discovered that certain herbal medicines could suppress this disease, which led to accomplishing the present invention.

In other words, the objective of the present invention lies in providing prevention and treatment drugs for bovine mastitis, as well as prevention and treatment methods for same.

The present invention provides prevention and treatment drugs for staphylococcal bovine mastitis, containing 1 or 2 kinds or more of herbal medicines selected from a group comprising kanzo, huang-lian, ougon, kouboku, tianjin, zhi-mu, chouji, kujin, keihi, biwayou, hops, youbaihi, enmeiso, gobaishi, sanshuyu, shakuyaku, jin ying, chiyu and maou.

Additionally, the present invention is to provide the aforementioned prevention and treatment drugs for staphylococcal bovine mastitis, containing herbal medicines in crude powder form, extracts of herbal medicines extracted with a mixture of water and organic solvents or with water, or active ingredients of herbal medicines.

Furthermore, the present invention is to provide prevention and treatment drugs for staphylococcal bovine mastitis by incorporating the herbal medicines into feed.

Furthermore, the present invention is to provide a prevention and treatment method for staphylococcal bovine mastitis due to bovine staphylococci, by administering an effective quantity of herbal medicine comprising 1 or 2 kinds or more of herbal medicines selected from a group comprising kanzo, huang-lian, ougon, kouboku, tianjin, zhi-mu, chouji, kujin, keihi, biwayou, hops, youbaihi, enmeiso, gobaishi, sanshuyu, shakuyaku, jin ying, chiyu and maou.

Furthermore, the present invention is to provide a prevention and treatment method for staphylococcal bovine mastitis, by administering herbal medicines in crude powder form, extracts of herbal medicines extracted with a mixture of water and organic solvents or with water, or in the form of the active ingredients of the herbal medicines.

Furthermore, the present invention is to provide a prevention and treatment method for staphylococcal bovine mastitis, by incorporating and administering herbal medicines into feed.

Kanzo (Kanzo [in Chinese characters]) is the root or root stem of kanzo (*Glycyrrhiza glabra* Linné var. *glandulifera* Regel et Herder) or the remains after removing the cork skin. The ingredients of this material comprise glycyrrhizin, liquiritin, glucose, asparagine, etc. It is utilized as a relaxant, anticonvulsant and expectorant for humans.

Huang-lian (Huang-lian [in Chinese characters]) is the root stem of huang-lian (*Coptis japonica* Makino) after removing the fine roots by burning them off. The ingredients of this material comprise berberine and palmatine. It is utilized as stomachic bitters and an enteric rectifying agent for humans.

Ougon (Ougon [in Chinese characters]) is the root of koganebana (*Scutellaria baicalensis* Georgi) after removing the cork skin. The ingredients of this material comprise ougonin and baicalin. It is utilized as an anti-inflammatory and anti-pyretic for humans

Kouboku (kouboku [in Chinese characters]) is the skin of the trunk and branches of Hoonoki (*Magnolia obovata* Thunborg). The ingredients of this material comprise magnocurarine, with essential oils including machilol and magnolol as the key ingredients. It is utilized as an astringent diuretic agent and for treating swelling sensation of the stomach, stomachaches and cough, as an expectorant for humans

Tianjin (tianjin [in Chinese characters]) is the root of tianjin (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). The ingredients of this material comprise tianshinone I and II and cryptotianshinone. It is utilized as a strengthening agent, emmenagogue and a medicine for women for treating irregular menstruation, endometrorrhagia, stomachaches and [illegible] for humans

Zhi-mu (zhi-mu [in Chinese characters]) is the root stem of zhi-mu (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge). The ingredients of this material comprise saponin, steroid saponin and tannin, etc. It is utilized as an anti-inflammatory, antipyretic, antidiarrheic, diuretic and analgesic for humans.

Chouji (chouji [in Chinese characters]) is the bud immediately before blossoming of chouji (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). The ingredients of this material comprise eugenol and acetyleugenol, etc. It is utilized as a stimulant for digestive function and insecticide for humans, and for applications as a flavoring and in cosmetics.

Kujin (kujin [in Chinese characters]) is the root itself of kurara (*Sophora angustifolia* Siebold et Zuccarini) or the root that is cut horizontally or vertically after most of the cork skin is removed. The ingredient of this material comprises matrine. It is utilized as a strengthening agent for the stomach, diuretic, antipyretic, analgesic and insecticide for humans

Keihi (keihi [in Chinese characters]) is the dry bark and branch skin of keiju (*Cinnamomum cassia* Blume) from which some cork skin is removed. The ingredients of this material comprise cinnamaldehyde and cinnamyl acetate. It is utilized as a diaphoretic, analgesic, stomach strengthening agent, enteric rectifying agent and insecticide for humans.

Biwayou (biwayou [in Chinese characters]) is the leaf of biwa (*Eriobotrya japonica* Lindley) from which much of the soft hair is removed. The ingredients of this material comprise glucose, sucrose, fructose, maltose, etc. It is utilized as a cooling agent and stomach strengthening agent, as well as for treating heat stroke or for its prevention, for humans.

Hops is ripe fruit of hops (*Humulus Lupulus* Linné). The ingredients of this material comprise tannin, humulone, lupulone, etc. It is a required material as a bitter agent and fragrant flavor for brewing beers.

Youbaihi (yobaihi [in Chinese characters]) is the tree bark of yamamomo (*Myrica rubra* Siebold et Zuccarini). The ingredients of this material comprise tannin, myricetin, myricitrin, etc. It is utilized as an astringent agent for diarrhea and is also effective for bruises for humans

Enmeiso (enmeiso [in Chinese characters]) is the stem leaf of hikikoshi (*Isodon japonicus* Hara) or kurobanahikiokoshi (*Isodon trichocarpus* Kudo). The ingredients of this material comprise plectranthin and enmein [transliteration]. It is utilized as a stomach strengthening bitters for humans for treating digestive disorders, lack of appetite and stomachaches.

Gobaishi (gobaishi [in Chinese characters]) is the gall growing mainly on the leaf of nurude (*Rhus javanica* Linne) due to stinging by the nurudenomimifushi aphid (*Melaphis chinensis* J. Bell). The ingredients of this material comprise tannin, gallic acid, fats, resin, etc. It is utilized as a material for preparing gobaishi tincture, tannic acid, gallic acid and pyrogallol.

Sanshuyu (sanshuyu [in Chinese characters]) is the material extracted from the seeds of ripe fruit of sanshuyu (*Cornus officinalis* Siebold et Zuccarini). The ingredients of this material comprise crystalline organic acids, gallic acid, malic acid, tartaric acid, etc. It is utilized as a nourishing agent, strengthening agent, and astringent for humans

Shakuyaku (shakuyaku [in Chinese characters]) is the root of shakuyaku (*Paeonia albiflora* Pallas var. *trichocarpa* Bunge). The ingredients of this material comprise benzoic acid, resins, etc. It is utilized as an astringent, relaxant, analgesic and anticonvulsant for humans.

Jin ying (jin ying [in Chinese characters]) is the pseudo-fruit of naniwaibara (*Rosa laevigata* Michaux). The ingredients of this material comprise citric acid, malic acid, tannin, saponin, vitamin C, etc. It is utilized for arresting diarrhea and pollakiuria for humans

Chiyu (chiyu [in Chinese characters]) is obtained by taking the root part of waremokou (*Sanguisorba officinalis* L.), followed by drying. The ingredients of this material comprise tannin (17%) and saponin. It is utilized as an astringent for treating hematemesis, coughing blood and profuse menstruation for humans

Maou (maou [in Chinese characters]) is the above ground stem of maou (*Ephedra sinica* Stapf). The ingredients of this material comprise l-ephedrine, d-pseudoephedrine, etc. It is utilized as antitussive, diaphoretic and diuretic for humans.

As shown above, each of the herbal medicines, namely, kanzo, huang-lian, ougon, kouboku, tianjin, zhi-mu, chouji, kujin, keihi, biwayou, hops, youbaihi, enmeiso, gobaishi, sanshuyu, shakuyaku, jin ying, chiyu and maou, has been utilized conventionally alone or in combination for preventing and treating diseases in humans. However, there has never been any

attempt to use them for the purpose of preventing and treating bovine diseases, particularly for the purpose of preventing and treating infectious bovine diseases.

The present inventors conducted various investigation focusing on the effectiveness of the aforementioned herbal medicines, and discovered that they were very effective in preventing and treating staphylococcal bovine mastitis, particularly *Staphylococcus aureus*, by administering 1 or 2 kinds or more of the aforementioned herbal drugs, thus the present invention was achieved.

In other words, as shown below, it was discovered that the aforementioned specific kinds of herbal medicines and extracts thereof have specific in vitro and in vivo antibacterial action and bactericidal effect against the bacterium *Staphylococcus aureus*. Consequently, the result of the inhibiting effect against *Staphylococcus aureus* revealed that bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* can be prevented and treated by administering these herbal medicines to cows.

Accordingly, the present inventors are the first ones to discover that these herbal medicines and extracts thereof are effective against this specific bovine disease, a result that has been beyond expectation.

These herbal medicines can be administered as they are in crude powder form, or as extracts or in the forms of the active ingredients of the herbal medicines, or by incorporating these materials into feed, or they are applied after being made into pharmaceutical preparations such as solution, suspensions, semisolid preparations, granulated preparations, molded preparations, eluting preparations and injectable preparations.

The extracts are extracted using solvents, for example, water, organic solvents, or a mixture of water and organic solvents, and they are utilized as they are, or after concentrate or dilution or after removing the solvents.

As the organic solvents, for example, methanol, ethanol, n-propanol, n-butanol, acetone, ethyl acetate, ether, methylene chloride, chloroform, benzene, carbon tetrachloride, petroleum ether are utilized, but methanol and ethanol are the particularly preferred ones. One kind or a mixture of two kinds or more of the organic solvents can be utilized.

The solvent extraction can be conducted by soaking these herbal medicines in these solvents at cold or warm temperatures. In the case of cold soaking, it can be carried out at temperature range of 15-25°C and in the case of warm soaking, 35-45°C. The extraction time depends on the extraction temperature, but it is generally is about 5 days or until the soluble components are sufficiently eluted.

The active ingredients of the herbal medicines can be obtained by, for example, further shaking the aforementioned extracts with various solvents, followed by taking the fraction that

partitions in this solvent and using the substance as the active fraction after removing the solvent, that is, or the active ingredient.

As examples of the solvents utilized in this case, non-polar solvents, for example, lower aliphatic ethers (diethyl ether, ethyl methyl ether, etc.), lower halogenated alkanes (chloroform, dichloroethane, dibromoethane, etc.), aromatics (benzene, toluene, xylene, etc.) and other petroleum solvents (petroleum ether, petroleum benzene, ligroin, etc.) can be cited.

Also, the residual aqueous solution is extracted by shaking with water and certain organic solvents saturated with water after sampling the active ingredients, followed by washing with water and removing the solvent from the residual organic solvent layer by means of distillation to obtain the active fraction that is the active ingredient.

The amount administered is in the range of 0.001 mg/kg body weight-100g/kg body weight, after converting to the weight of the crude powders of the herbal medicines. The amount administered varies with the purpose of administration, either as prophylaxis or treatment. In general the administered amount is higher for the latter.

The administration method can be oral or non-oral administration and, as the non-oral administration methods, intramuscular, intraperitoneal, transdermal, transnasal and intravenous administration can be performed.

Effect of the invention

According to the above detailed explanation, effective prophylactic and treatment drugs as well as effective prophylactic and treatment methods for staphylococcal bovine mastitis can be provided by the present invention.

The prophylactic and treatment drugs of the present invention utilize herbal medicines or extracts obtained thereof as the key medicines, and therefore there would be no occurrence of the drug-resistant bacteria that are the case in antibiotic administration, nor is there a problem of side effects, and thus safe administration can be conducted.

Additionally, because there are concerns of the effect about residual drugs on human bodies, these drugs are also suitable for application as drugs for preventing and treating staphylococcal mastitis, in cattle as beef for food consumption.

Furthermore, compared to using antibiotics, prophylaxis and treatment can be achieved at a low cost.

The present invention is further explained in detail in the following using test and application examples.

Test Example 1

The sensitivities of *Staphylococcus aureus* to various herbal medicines were investigated.

Each herbal medicine was added to a 7-fold quantity of 50% aqueous ethanol with respect to the amount of herbal medicine, and alcohol extraction was carried out for 16 h.

8mm discs were impregnated with 25 μ L, respectively, and dried. The discs were placed in Hat-infusion agar medium spread with *Staphylococcus aureus*, and, after incubating for 18 h at 37°C, the diameter of the circles of inhibition were determined.

The experimental results are shown in the following Table 1.

Table 1

① 生薬名 ② アルコール抽出物による 阻止円 (mm)		① 生薬名 ② アルコール抽出物による 阻止円 (mm)	
③	カンゾウ	12	①⑧ 漢 1 (続き)
④	オウレン	12	①⑨ シャクヤク 10
⑤	オウゴン	11	②⑩ キンオウレ 9
⑥	コウボク	11	②⑪ チ ユ 11
⑦	タンジン	17	②⑫ マ オ ウ 11
⑧	チモ	16	
⑨	チヨウジ	12	
⑩	クジン	11	
⑪	ケイヒ	11	
⑫	ビフヨウ	9	
⑬	ホップ	10	
⑭	ヨウバイヒ	13	
⑮	エンメイソウ	15	
⑯	ゴバイシ	17	
⑰	サンシュユ	11	

- Key: 1 Name of herbal medicine
 2 Circle of inhibition due to the alcohol extract
 3 Kanzo
 4 Huang-lian
 5 Ougon
 6 Kouboku
 7 Tianjin
 8 Zhi-mu
 9 Chouji
 10 Kujin
 11 Keihi
 12 Biwayou
 13 Hops
 14 Youbaihi
 15 Enmeiso
 16 Gobaishi
 17 Sanshuyu
 18 Table 1 (continued)
 19 Shakuyaku

- 20 Jin ying
- 21 Chiyu
- 22 Maou

Application Example 1

Basic feed

Pressed barley	22.2 parts by weight
Corn	6.3
Beerlees slurry	25.3
Vitamin-mineral supplement	0.3
Italian rye grass silage	28.5
Dry Italian rye grass	17.4

Huang-lian powder was added to the aforementioned basic feed at 1 wt% to serve as the sample feed. 50 cows of about 36-48 months of age were allowed to ingest the sample feed freely immediately after giving birth, and feed was continued for 300 days. Additionally, in the control area, the aforementioned basic feed was used in place of the sample feed.

Accordingly, the number of infected cows with mastitis caused by *Staphylococcus aureus* in the fields during the feeding period was observed. The result showed that 0/50 head of cows in the experimental area of the present invention had mastitis while 12/50 head of cows in the control area were infected.

Application Examples 2-19

Experiments were carried out in the same manner as in Application Example 1, except that the herbal medicines shown in Table 2 below were used to replace huang-lian in Application Example 1.

Consequently, the results shown in the following table were obtained.

Table 2

②班 2 (続き)				
① 実験例	② 生薬名	③ 乳房炎に染った乳牛	④ 実験区	⑤ 対照区
2	カンゾウ	1/50頭	12/50頭	7
3	ウゴン	1/50	12/50	
4	コウベク	1/50	12/50	
5	テンジン	0/50	12/50	
6	チモ	0/50	12/50	
7	クワジ	1/50	12/50	
8	チジン	1/50	12/50	
9	ケイヒ	1/50	12/50	
10	ビヨウ	1/50	12/50	
11	ホップ	1/50	12/50	
12	ヨウバイヒ	0/50	12/50	
13	エンメイソウ	0/50	12/50	
14	ゴバイシ	0/50	12/50	
15	サンシュユ	1/50	12/50	
16	シャクヤク	1/50	12/50	
17	キンオウシ	1/50	12/50	

- Key:
- 1 Application example
 - 2 Name of herbal medicine
 - 3 Infected cows with mastitis
 - 4 Experimental area
 - 5 Control area
 - 6 Kanzo
 - 7 Head
 - 8 Ougon
 - 9 Kouboku
 - 10 Tianjin
 - 11 Zhi-mu
 - 12 Chouji
 - 13 Kujin
 - 14 Keihi
 - 15 Biwayou
 - 16 Hops
 - 17 Youbaihi
 - 18 Enmeiso
 - 19 Gobaishi
 - 20 Sanshuyu
 - 21 Shakuyaku
 - 22 Jin ying
 - 23 Table 2 (continued)
 - 24 Chiyu
 - 25 Maou

Application Example 20

One kg each of kanzo, huang-lian, ougon, kouboku, tianjin, zhi-mu, chouji, kujin, keihi, biwayou, hops, youbaihi, enmeiso, gobaishi, sanshuyu, shakuyaku, jin ying, chiyu and maou was weighed and put in 10 L water respectively, followed by extraction for 1 h at 100°C. Each aqueous extract was diluted 1000-fold for use as an extract.

Instead of water, each of the aforementioned extracts was given to 50 head of cows of about 36-48 months in age immediately after giving birth. The same basic feed as in Application Example 1 was used as the feed.

Also, instead of the aforementioned extracts, water was given in the control area.

Feeding was carried out for 10 months as in the aforementioned, and the number of with mastitis caused by *Staphylococcus aureus* in the fields during the feeding period was observed.

The result showed that the number of infected heads with mastitis in the experimental area of the present invention was less than that in the control area.

⑫ 公開特許公報(A)

平1-172332

⑪ Int. Cl.⁴A 61 K 35/78
A 23 K 1/16
1/18

識別記号

A E Z
3 0 4

庁内整理番号

8413-4C
C-6754-2B
B-6754-2B

⑬ 公開 平成1年(1989)7月7日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 牛の乳房炎の予防及び治療剤

⑮ 特 願 昭62-328329

⑯ 出 願 昭62(1987)12月26日

⑰ 発 明 者 柴 田 健 次 埼玉県川越市小堤894番地2 (川越ビレジ3-103号)
 ⑰ 発 明 者 小 島 正 美 埼玉県比企郡川島町大字表32番地13
 ⑰ 発 明 者 中 尾 浩 之 埼玉県川越市末広町3丁目4番地8
 ⑰ 出 願 人 日 清 製 粉 株 式 会 社 東京都中央区日本橋小網町19番12号
 ⑰ 代 理 人 弁 理 士 高 木 千 嘉 外2名

明 細 書

1. 発明の名称 牛の乳房炎の予防及び治療剤

2. 特許請求の範囲

1) カンゾウ、オウレン、オウゴン、コウボク、
タンジン、チモ、チョウジ、クジン、ケイヒ、
ビワヨウ、ホップ、ヨウバイヒ、エンメイソウ、
ゴバイシ、サンシュユ、シャクヤク、キンオウ
シ、チュ及びマオウからなる群から選択された
1種または2種以上の生薬を含有する牛のブド
ウ球菌による乳房炎の予防及び治療剤。

2) 生薬が原末の形態である特許請求の範囲第1
項に記載の予防及び治療剤。

3) 生薬が有機溶剤、水と有機溶剤との混合物ま
たは水で抽出した生薬エキス及び／またはそれ
から得られる生薬有効成分である特許請求の範
囲第1項に記載の予防及び治療剤。

4) 生薬が、飼料中に配合されてなる特許請求の
範囲第1項に記載の予防及び治療剤。

5) カンゾウ、オウレン、オウゴン、コウボク、

タンジン、チモ、チョウジ、クジン、ケイヒ、
ビワヨウ、ホップ、ヨウバイヒ、エンメイソウ、
ゴバイシ、サンシュユ、シャクヤク、キンオウ
シ、チュ及びマオウからなる群から選択された
1種または2種以上の生薬の有効量を投与する
ことからなる牛のブドウ球菌によるブドウ球菌
の予防及び治療方法。

6) 生薬が、原末の形態で用いられる特許請求の
範囲第5項に記載の予防及び治療方法。

7) 生薬が有機溶剤、水と有機溶剤との混合物ま
たは水で抽出した生薬エキス及び／またはそれ
から得られた生薬有効成分である特許請求の範
囲第5項に記載の予防及び治療方法。

8) 生薬が、飼料に混合して投与される特許請求
の範囲第5項に記載の予防及び治療方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、牛の乳房炎の予防及び治療剤並びに
予防及び治療方法に関する。

さらに詳しくは、牛のブドウ球菌による乳房炎

の生薬含有の予防及び治療剤並びに生薬を投与することからなる予防及び治療方法に関する。

〔従来の技術〕

牛のブドウ球菌による乳房炎は、牛の乳房炎のうちブドウ球菌、特にスタフィロコッカス アウレウス *Staphylococcus aureus* の感染によって起こるものである。

本疾病は、乳量の減少、乳質の低下、供用年数の短縮、他牛への感染源となることなど酪農経営上大きな損害を与えている。また乳汁が細菌で汚染されることは、公衆衛生上にも悪影響を与える。

このような重大な伝染病であるにもかかわらず、有効な対策はほとんどなく、適切な飼育管理を行なうことなどの対策がとられているが、実際には予防できないことが多い。

また、これまでに本疾病を予防及び治療するために、例えば抗生物質やその他の抗菌剤を飼料と共に投与する方法も行なわれている。しかし、近年特に耐性菌の発生や動物への抗生物質等の残留

性の問題などがあって、抗生物質などの投与を家畜等に対して行なうことは適当でないという気運が高まりつつある。従って、抗生物質などを用いない本症の予防及び治療方法と予防及び治療剤の開発が望まれている。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、上記の問題点を解決すべく研究した結果、ある種の生薬に本疾病を抑制する効果がある事を見出し、本発明を完成させた。

即ち、本発明の目的は、牛のブドウ球菌による乳房炎の予防及び治療剤並びに同症の予防及び治療方法を提供することにある。

本発明はカンゾウ、オウレン、オウゴン、コウボク、タンジン、チモ、チョウジ、クジン、ケイヒ、ビワヨウ、ホップ、ヨウバイヒ、エンメイソウ、ゴバイシ、サンシュユ、シャクヤク、キンオウシ、チユ及びマオウからなる群から選択された1種または2種以上の生薬を含有する牛のブドウ球菌による乳房炎の予防及び治療剤を提供するものである。

の予防及び治療方法を提供するものである。

本発明はまた生薬を飼料中に配合して投与することからなる牛のブドウ球菌による乳房炎の予防及び治療方法を提供するものである。

カンゾウ（甘草）は、カンゾウ（*Glycyrrhiza glabra* Linné var. *glandulifera* Regel et Herder）の根及び根茎をそのまま、またはコルク皮を除いたものである。このものは成分としてグリシルリチン、リキリチン、ブドウ糖、アスパラギン等を含み、ヒトの緩和、鎮痛薬、祛痰薬として用いられている。

オウレン（黄連）は、オウレン（*Coptis japonica* Makino）の根茎から細根を除去したものである。このものは成分としてベルベリン、パルマチン等を含みヒトの健胃苦味、整腸薬として用いられている。

オウゴン（黄芩）は、コガネバナ（*Scutellaria baicalensis* Georgi）のコルク皮を除いた根である。このものは成分としてオーゴニンとバイカリンを含み、ヒトの消炎、解熱薬として用いられ

本発明はまた、原末の形態の生薬、有機溶剤、有機溶剤と水との混合物または水で抽出して得られる生薬エキス、または生薬有効成分を含有する上記の牛のブドウ球菌による乳房炎の予防及び治療剤を提供するものである。

本発明はまた、生薬を飼料中に配合してなる牛のブドウ球菌による乳房炎の予防及び治療剤を提供するものである。

さらに本発明はカンゾウ、オウレン、オウゴン、コウボク、タンジン、チモ、チョウジ、クジン、ケイヒ、ビワヨウ、ホップ、ヨウバイヒ、エンメイソウ、ゴバイシ、サンシュユ、シャクヤク、キンオウシ、チユ及びマオウからなる群から選択された1種または2種以上の生薬の有効量を投与することからなる牛のブドウ球菌によるブドウ球菌の予防及び治療方法を提供するものである。

本発明はまた、原末の形態の生薬、有機溶剤、有機溶剤と水との混合物または水で抽出して得られる生薬エキス、または生薬有効成分の形態で投与することからなる牛のブドウ球菌による乳房炎

ている。

コウボク（厚朴）は、ホオノキ（*Magnolia obovata* Thunberg）の樹皮及び枝の皮である。このものは成分として、マグノクラリン、主成分をマチロール、マグノロールとする精油を含み、ヒトの収れん性利尿、祛痰薬として胸腹部の膨満、腹痛及び咽喉に用いられている。

タンジン（丹参）はタンジン（*Salvia miltiorrhiza* Bunge）の根である。このものは成分として、タンジノンⅠ、Ⅱ、クリプトタンジノンを含み、ヒトの強壯、通経、婦人薬として月経不調、子宮出血、腹痛及び諸瘡に用いられる。

チモ（知母）は、ハナスゲ（*Anemaphysa asphodeloides* Bunge）の根茎である。このものは成分としてサポニン、ステロイドサポニン、タンニン等を含み、ヒトの消炎、解熱、止瀉、利尿、鎮痛薬として用いられている。

チョウジ（丁子）は、チョウジ（*Eugenia caryophyllata* Thunb.）の開花直前のつぼみである。このものは成分としてオイゲノール、アセチ

ルオイゲノール等を含み、ヒトの消化機能促進、駆虫薬として、また香辛料、化粧品としても用いられている。

クジン（舌参）は、クララ（*Sophora augustifolia* Siebold et Zuccarini）の根をそのまま、またはコルク皮の大部分を除いて横切または縦割したものである。このものは成分としてマトリンを含み、ヒトの健胃、利尿、解熱、鎮痛及び殺虫薬として用いる。

ケイヒ（桂皮）は、ケイジュ（*Cinnamomum Cassia* Blume）の乾皮及び枝皮を剥ぎコルク層を多少除いたものである。このものは成分として、シンナムアルデヒド、酢酸シンナミル等を含み、ヒトの発汗、解熱、鎮痛、健胃、整腸、駆虫薬として用いられている。

ビワヨウ（批把葉）は、ビワ（*Eriobotrya Japonica* Lindley）の葉の軟毛をできるだけ除いたものである。このものはブドウ糖、ショ糖、果糖、マルトース等を成分として含み、ヒトの清涼、健胃薬として暑熱あたりやその予防薬として用い

られていたものである。

ホップは、ホップ（*Humulus Lupulus* Linné）の成熟した果穂である。このものは成分としてタンニン、フムロン、ルブロン等を含み、ビールの醸造において、苦味及び芳香を附けるために必要なものである。

ヨウバイヒ（楊梅皮）は、ヤマモモ（*Myrica rubra* Siebold et Zuccarini）の樹皮である。このものは成分としてタンニン、ミリセチン及びミリシトリン等を含み、ヒトの収れん薬として下痢に用い、また打撲症に効果がある。

エンメイソウ（延命草）は、ヒキオコシ（*Isodon japonica* Hara）またはクロバナヒキオコシ（*Isodon trichocarpus* Kudo）の茎葉である。このものは成分として、プレクトランチン及びエンメインを含み、ヒトの健胃苦味薬として消化不良、食欲不振、腹痛等の治療に用いられる。

ゴバイシ（五倍子）は、ヌルデノミミフシアブラムシ（*Metaphis chinensis* J. Bell）の刺傷により主としてヌルデ（*Rhus javanica* Linné）の

葉に生じたゴールであって、成分としてタンニン、没食子酸、脂肪、樹脂等を含む。五倍子チンキ、タンニン酸、没食子酸、ピロガロールの製造原料とされる。

サンシュユ（山茱萸）は、サンシュユ（*Cornus officinalis* Siebold et Zuccarini）の成熟した果実から種子を抽いたものである。このものは成分として結晶性の有機酸、没食子酸、リンゴ酸、酒石酸等を含む。ヒトの滋養、強壯、収れん薬として用いられている。

シャクヤク（芍薬）は、シャクヤク（*Paeonia albiflora* Pallas var. *trichocarpa* Bunge）の根である。成分として安息香酸、樹脂等を含む。ヒトの収れん、緩和、鎮痛、鎮痙薬として用いられている。

キンオウシ（金櫻子）は、ナニワイバラ（*Rosa laevigata* Michaux）の偽果である。成分としてクエン酸、リンゴ酸、タンニン、サポニン、ビタミンC等を含む。ヒトの下痢や多尿を止めるのに用いられている。

チュウ（地榆）は、ワレモコウ（*Sanguisorba officinalis* L.）の根部を採り、乾燥したものである。成分として、タンニン（17%）、サポニンを含む。ヒトの止血収れん薬として、吐血、咯血、月経過多に用いられる。

マオウ（麻黄）は、マオウ（*Ephedra sinica* Stapf）の地上茎である。成分として、*l*-エフェドリン、*d*-シュードエフェドリン等を含む。ヒトの鎮咳、発汗、利尿薬として用いられている。

上記したように、本発明で用いる生薬のカンゾウ、オウレン、オウゴン、コウボク、タンジン、チモ、チョウジ、クジン、ケイヒ、ピワヨウ、ホップ、ヨウバイヒ、エンメイソウ、ゴバイシ、サンシュユ、シャクヤク、キンオウシ、チュ及びマオウの々は、それらを単独でか、または組合わせてヒトの疾病の予防及び治療のために従来から使用されていたものである。しかし、これらを牛の疾病の予防及び治療の目的、殊に牛の感染症の予防及び治療の目的で使用する試みはこれまでになされたことがなかった。

これら生薬は原末そのまま、または抽出エキス、生薬有効成分の形態で直接投与したり、またこれらのものを飼料に添加したりあるいは溶液製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒体制剤、成型製剤、浸出製剤、注射用製剤等に製剤化して使用する。

抽出エキスは、例えば水、有機溶剤または水と有機溶剤との混合物を使用して溶剤抽出し、それをそのままか、濃縮してか、希釈してか、または溶剤を除去して用いられる。

有機溶剤としては、例えばメタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール、アセトン、酢酸エチル、エーテル、塩化メチレン、クロロホルム、ベンゼン、四塩化炭素、石油エーテル等が使用され、特にメタノール、エタノールが望ましい。これらの有機溶剤は1種または2種以上の混合物として用いることができる。

この溶剤抽出は、生薬をこれらの溶剤に冷浸または温浸して行なうことができる。冷浸の場合には15～25℃、温浸の場合は35～45℃の温度範囲で

本発明者らは、上記した生薬の薬効に着目して種々研究の結果、牛がブドウ球菌、特に *Staphylococcus aureus* に感染することによって発生する乳房炎の予防及び治療に、上記した生薬の1種または2種以上を組合わせて投与することがきわめて有効であることを見出して本発明を完成したのである。

即ち、下記するように、上記特定の種類の生薬及びそれらの抽出物がインピトロ及びインピボにおいて細菌 *Staphylococcus aureus* に対し特異的に静菌作用及び殺菌作用があることが明らかになった。そしてこの *Staphylococcus aureus* に対する抑制効果の結果、これら生薬を牛に投与した場合に *Staphylococcus aureus* を原因とする牛の疾病である乳房炎を予防及び治療することができたのである。

そしてこの牛に特有の疾病に対してこれら生薬及びその抽出物が有効であることは予想もしえなかったことで、本発明者らによってはじめて明らかにされたことである。

行なうことができる。抽出時間は、抽出温度によって異なるが、一般的には約5日間または可溶性成分が充分に溶けるまでとする。

生薬有効成分は、例えば、上記抽出エキスをさらに各種溶剤を用いて振盪し、この溶剤に移行する画分を採り出し、その溶剤を留去したものを有効画分、即ち有効成分として用いることもできる。

この場合に使用される溶剤は、非極性溶剤例えば、低級脂肪族エーテル類（ジエチルエーテル、エチルメチルエーテル等）；低級ハロゲンアルカン類（クロロホルム、ジクロロエタン、ジブロモエタン等）；ベンゼン類（ベンゼン、トルエン、キシレン等）；その他の石油系溶剤（石油エーテル、石油ベンゼン、リグロイン等）等が例としてあげられる。

また、この有効画分を採り出した残りの水溶液を、水及びある種の有機溶剤に水を飽和させたものを使用することにより振盪抽出し、水洗し、残分である有機溶剤層に移行する画分の溶剤を留去

したものも、有効成分即ち有効成分として用いることができる。この有効成分は上記の有効成分とは、物理化学的性質が異なり、検出される成分も異なるものである。

投与量は、生薬の原末重量で換算して0.001mg/体重kg/日～100 g/体重kg/日の範囲である。この量は予防剤として用いる場合と治療剤として用いる場合では異なり、一般的には後者の方が投与量は多くなる。

投与方法は、経口投与または非経口投与とことができ、非経口投与としては筋肉内投与、腹腔内投与、経皮投与、経鼻投与、静脈内投与等が可能である。

【発明の効果】

以上詳述したように、本発明によれば牛のブドウ球菌による乳房炎の有効な予防及び治療剤並びに有効な予防及び治療方法が提供される。

本発明の予防及び治療剤は生薬またはそれから得られるエキス等を主薬とするため、抗生物質等の場合の耐性菌の発生や副作用の問題が全くなく、

安心して投与することができる。

また、薬剤の残留による人体への影響の心配がないため、肉用牛に対するブドウ球菌による乳房炎の予防及び治療のための薬物として適当である。

さらに、抗生物質等を用いる場合に比べて、安価に同疾病を予防及び治療することができる。

以下本発明を試験例及び実施例によりさらに詳しく説明する。

試験例 1

Staphylococcus aureus の各種生薬に対する感受性を調べた。

各種生薬を、生薬に対し7倍量の50%エタノール水溶液中に加え、16時間抽出してアルコール抽出物とした。

抽出物を直径8mmのディスクに25μlずつしみ込ませ乾燥させた。このディスクを*Staphylococcus aureus* の菌株を塗ったハート・インフュージョン寒天培地に置き、37℃で18時間培養した後阻止円の直径を測定した。

次にその試験結果を示せば表1のとおりである。

表 1 (続き)

生 薬 名	アルコール抽出物による 阻止円 (mm)
カンゾウ	12
オウレン	12
オウゴン	11
コウボク	11
タンジン	17
チモ	15
チョウジ	12
クジン	11
ケイヒ	11
ビワヨウ	9
ホップ	10
ヨウバイヒ	13
エンメイソウ	15
ゴバイシ	17
サンシュユ	11

生 薬 名	アルコール抽出物による 阻止円 (mm)
シャクヤク	10
キンオウシ	9
チユ	11
マオウ	11

実施例 1

基礎飼料

庄ペン大麦	22.2重量部
とうもろこし	6.3 "
ビール粕	25.3 "
ビタミンミネラル剤	0.3 "
イタリアンライグラスサイレージ	28.5 "
イタリアンライグラス乾燥	17.4 "

(以下余白)

前記基礎飼料にオウレン粉末を重量比で1%添加し供試飼料とした。この供試飼料を分娩直後の約38~48か月令の乳牛50頭に自由に摂餌させ、300日間飼育した。また対照区は供試飼料に代えて前記基礎飼料を与えた。

そして飼育期間中に野外感染によつて *Staphylococcus aureus* による乳房炎になった乳牛の頭数を観察した。その結果本発明の試験区で乳房炎に患った乳牛は0頭/50頭であったが対照区では12頭/50頭であった。

実施例 2~19

実施例1においてオウレンの代わりに下記表2に示す生薬を用いたこと以外は実施例1と同様に行なった。

次にその結果を示せば下表のとおりである。

(以下余白)

表 2

実施例	生 薬 名	乳房炎に患った乳牛	
		試 験 区	対 照 区
2	カンゾウ	1/50頭	12/50頭
3	オウゴン	1/50	12/50
4	コウボク	1/50	12/50
5	タンジン	0/50	12/50
6	チモ	0/50	12/50
7	チョウジ	1/50	12/50
8	クジン	1/50	12/50
9	ケイヒ	1/50	12/50
10	ビワヨウ	1/50	12/50
11	ホップ	1/50	12/50
12	ヨウバイヒ	0/50	12/50
13	エンメイソウ	0/50	12/50
14	ゴバイシ	0/50	12/50
15	サンシュユ	1/50	12/50
16	シャクヤク	1/50	12/50
17	キンオウシ	1/50	12/50

表 2 (続き)

実施例	生 薬 名	乳房炎に患った乳牛	
		試 験 区	対 照 区
18	チユ	1/50頭	12/50頭
19	マオウ	1/50	12/50

実施例 20

カンゾウ、オウレン、オウゴン、コウボク、タンジン、チモ、チョウジ、クジン、ケイヒ、ビワヨウ、ホップ、ヨウバイヒ、エンメイソウ、ゴバイシ、サンシュユ、シャクヤク、キンオウシ、チユ及びマオウの各々を1kgとり、これを夫々10Lの水に入れ100℃で1時間抽出した。各々の水抽出物を1000倍に希釈し抽出エキスをとした。

分娩直後の約38~48か月令の乳牛を50頭使用し、前記抽出エキスを水代わりに給与した。飼料は実施例1で使用したものと同じ基礎飼料を用いた。

なお対照区は前記抽出エキスの代わりに水を与えた。

前記のようにして10か月間飼育し、その期間中に *Staphylococcus aureus* の野外感染によって乳房炎になった頭数を観察した。

その結果本発明の試験区は対照区より乳房炎の発症頭数が少なかった。

特許出願人 日清製粉株式会社

代理人 弁理士 高 木 千 重

外2名